

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Avaliação da exposição ao metilmercúrio e dieta rica em selênio sobre os níveis de óxido nítrico na população da região amazônica

Kátia Cristina De Marco

Ribeirão Preto – SP

2007

Kátia Cristina De Marco

Avaliação da exposição ao metilmercúrio e dieta rica em selênio sobre os níveis de óxido nítrico na população da região amazônica

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do título de Mestre em Toxicologia.
Área de Concentração: Toxicologia**

Orientador: Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior

Ribeirão Preto – SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Marco, Kátia Cristina

Avaliação da exposição ao metilmercúrio e dieta rica em selênio sobre os níveis de óxido nítrico na população da região amazônica. Ribeirão Preto, 2007.

53p.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Toxicologia

Orientador: Barbosa Junior, Fernando

1- metilmercúrio. 2- selênio. 3- óxido nítrico.
4- alterações cardiovasculares.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Kátia Cristina de Marco

Avaliação da exposição ao metilmercúrio e dieta rica em selênio sobre os níveis de óxido nítrico na população da região amazônica.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do título de Mestre em Toxicologia.
Área de Concentração: Toxicologia.

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Assinatura:** _____

Defendida e aprovada pela Comissão Julgadora em: ____/____/____

**A meus pais que souberam me educar e
acima de tudo me preparar para as escolhas
que teria que fazer na vida.**

**A todos e a tudo que abri mão para estar
concluindo mais essa fase!**

AGRADECIMENTOS

Um muito obrigado ao meu orientador Fernando Barbosa Jr que teve paciência e boa vontade em me aceitar como aluna, com mais da metade do meu prazo esgotado, me ajudou demais, foi verdadeiramente um parceiro. Devo muito a ele!!!!

Aos meus pais, Beto e Dete, que sempre me ensinaram buscar algo mais, chorar se necessário, mas não desistir, pois somente eu teria o poder de mudar e alavancar minha vida. Amo muito vocês!! Ao meu irmão Bill e minha cunhada Mara, pelo grande carinho e a alegria da possibilidade de um sobrinho, ou sobrinha! A minha avó, Lólo, pela preocupação constante e imenso amor que demonstra por mim.

A minha madrinha, Tia Rose, e meu Padrinho, que me deram condições de iniciar todo esse caminho, desde os tempos do 2o. grau. Acreditaram muito em mim, me apoiaram e muito dessa conquista dedico a eles. Espero que se sintam realizados...

A minha tia Cláudia, meu tio Taliano gosto muito de vocês... ainda mais por terem me dado a honra de ter Bianca e Beatriz, que eu amo de paixão, e que sempre me trouxeram alegria e muita saudade... por tantos abraços e beijos (na boca..rsrsrs)!!!

Ao meu avô Ivo e a Landa, que sempre me receberam com muito entusiasmo e alegria, me motivando a cada visita.

Ao meu grande companheiro, Rodrigo, não só pelas inúmeras vezes que quase me matou de susto, ou de tanto rir...enfim, mas por ter me apoiado em momentos de decisão.

Aos meus amigos, Gui, Henrique, Kaka e Valzinha...gosto muito de vocês. Vou carregá-los pra sempre nos meus sentimentos mais gostosos... Pela saudosa convivência e pelos bons momentos de farra!!!!

A Tati, minha irmazinha de quem sinto imensa saudade, pelas horas de papo na sacada, pelos risos descontrolados (mesmo que de desespero...rsrs) e pela grande companheira que foi pra mim.

A todas as pessoas que acreditaram e acima de tudo torceram por mim.

Aos voluntários que participaram do estudo.

À todos da pós-graduação da Faculdade de Farmácia, em especial a Ana, pela paciência e comprometimento, pela dedicação de uma maneira geral. Sou muito grata a vocês.

Aos membros julgadores dessa dissertação.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	i
Lista de figuras.....	ii
Resumo	iii
Abstract.....	v
I – INTRODUÇÃO	
Exposição ao mercúrio e suas espécies químicas	1
Exposição ao metilmercúrio no Brasil.....	2
Toxicocinética do metilmercúrio e seus impactos à saúde humana.....	4
Intoxicação por mercúrio como um fator de aumento do risco cardiovascular.....	6
Intoxicação pelo mercúrio como um fator de aumento do risco cardiovascular por possíveis interações com o sistema do óxido nítrico	7
Selênio: vias metabólicas e efeitos no corpo humano.....	12
Interação entre selênio e mercúrio	15
II – OBJETIVOS.....	17
III – MATERIAL E MÉTODOS	
III-a - Efeitos da intoxicação ambiental por metilmercúrio sobre a biodisponibilidade sistêmica de NO	18
III-b - Detalhamento dos métodos empregados.....	19
III.b.1 – Determinação de mercúrio em sangue total e plasma	19
III.b.2 - Determinação de mercúrio em cabelo.....	20
III.b.3 – Materiais de referência para controle dos resultados de mercúrio e selênio em sangue total e plasma	21
III.b.4 – Determinação das concentrações plasmáticas de nitritos	21
III-c Análise estatística	22

IV – RESULTADOS	23
V – DISCUSSÃO.....	32
VI – CONCLUSÕES.....	38
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
ANEXOS	51

LISTA DE ABREVIATURAS

Hg⁰ - mercúrio metálico

i-Hg – mercúrio inorgânico

o-Hg – mercúrio orgânico

HgS – mercúrio total no sangue

HgP – mercúrio total no plasma

HgE – mercúrio total nos eritrócitos

HgC – mercúrio total no cabelo

i-HgC – mercúrio inorgânico no cabelo

o-HgC – mercúrio orgânico no cabelo

MeHg - metilmercúrio

Se = selênio

Se⁻² – selenido

SeO₄⁻² – selenato

SeO₃⁻² - selenito

SeMet – selenometionina

SeCys – selenocisteína

SeIP – selenoproteína-P

eGPx – glutathiona peroxidase extra-celular

NO - óxido nítrico

eNOS - sintase endotelial do óxido nítrico

mmHg - milímetros de mercúrio

HNO₃ – ácido nítrico

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – NO circulante no endotélio. Desde que o NO é liberado ele exerce seus efeitos sobre as células da parede vascular e também no lúmen, sendo que uma parte significativa do NO produzido pelo endotélio age diretamente sobre o sangue. O NO é então rapidamente metabolizado pela hemoglobina presente nos eritrócitos, parte do NO bioativo é conservado no sangue agindo diretamente sobre células sanguíneas incluindo plaquetas, leucócitos e eritrócitos, sofrendo reações oxidativas e nitrosativas no plasma e eritrócitos, sendo transportado através dos vasos (Rassaf et al, 2004)..... 9
- Figura 2** – Potenciais vias de decomposição do NO no sangue humano. No plasma o NO pode reagir com oxigênio molecular, formando nitrito (NO_2^-) ou peroxinitrito (OONO^-), com subsequente decomposição do nitrito a nitrato (NO_3^-). Uma alternativa é o grupo nitrosônio do NO reagir com tióis formando nitrosotióis (RSNO). Além disso o NO pode reagir com a oxihemoglobina eritrocitária formando metahemoglobina (metHb) e NO_3^- , ou com a deoxihemoglobina resultando na nitrosilhemoglobina (NOHb), ou ainda com o resíduo Cys93 da subunidade β da hemoglobina. E ainda, o NO_2^- plasmático pode entrar em contato com os eritrócitos, sofrendo uma oxidação dependente de hemoglobina, que resulta na formação de NO_3^- . SNOAlb, S-nitrosilalbumina; GSNO, S-nitrosoglutationa; CysNO, S-nitrosocisteína, RSH, grupo sulfidríla (Lauer et al, 2002). 11
- Figura 3.** Correlação entre os níveis de mercúrio: (A) no plasma e no sangue e (B) no sangue e no cabelo27
- Figura 4.** Correlação entre os níveis de nitrito plasmático e a razão HgP/HgS 28
- Figura 5.** Correlação entre os níveis de selênio nas amostras de sangue e plasma29
- Figura 6.** Correlação entre os níveis de selênio e mercúrio presentes no sangue dos voluntários do estudo30
- Figura 7.** Correlação entre os níveis de nitrito plasmático e a razão HgP/SeP 31

RESUMO

RESUMO

Desde os anos 50 o mercúrio tem chamado a atenção de muitos pesquisadores. No Brasil, a preocupação inicial se restringia à exposição humana pelo seu uso na mineração do ouro. Entretanto, nos últimos anos a atenção de muitos pesquisadores se voltou para outras fontes de exposição, incluindo fontes naturais. Na região Amazônica, os solos são naturalmente ricos em mercúrio. Devido a constante degradação da floresta, o solo se torna mais exposto à ação das chuvas que facilitam a passagem do mercúrio aos rios. Na água o mercúrio sofre um processo de metilação, se transformando em metilmercúrio (MeHg) que se acumula principalmente nos peixes da região. As populações ribeirinhas, que têm sua alimentação baseada no consumo de peixes, são as principais vítimas da exposição a este metal.

Muito tem se estudado a respeito dos efeitos tóxicos do metilmercúrio, reconhecido como a forma do mercúrio mais perigosa à saúde humana, devido à alta solubilidade para atravessar barreiras biológicas, capacidade de bioacumulação e elevada meia-vida de eliminação dos tecidos.

Dentre os efeitos tóxicos mais documentados do MeHg, encontram-se aqueles relacionados ao sistema nervoso. Entretanto, o sistema cardiovascular tem tomado destaque como um outro alvo a toxicidade do metal. Apesar do número considerável de estudos nesta área, ainda não há um consenso quanto aos mecanismos cardiotóxicos do mercúrio e muitos resultados em estudos clínicos são muito conflitantes.

Alguns estudos em ratos sugerem uma relação entre a diminuição de disponibilidade do óxido nítrico (NO), com aumento na exposição ao metilmercúrio.

O NO é um componente de extrema importância na fisiologia cardiovascular,

porque mantêm o tônus vascular e inibe a agregação plaquetária.

Por outro lado, uma dieta rica em peixes e castanhas, comum na região Amazônica, fornece ao organismo quantidades consideráveis de selênio (Se), um nutriente conhecido por propriedades antioxidantes bem como antagonista de efeitos tóxicos de alguns metais, principalmente o mercúrio. Isso sugere que os efeitos danosos do MeHg podem ser minimizados pela presença de selênio na dieta.

Neste sentido, o presente estudo avaliou em uma população ribeirinha (n=265), do Rio Tapajós, no Estado do Pará a relação entre as concentrações de mercúrio e selênio em sangue, plasma e cabelo e os níveis de óxido nítrico no plasma.

ABSTRACT

ABSTRACT

Since the 1950s, the mercury has attracted attention of many researchers. In Brazil, the initial concern was restricted to human exposure of its use in gold mining. However in the latest years, many researchers have concerned to others exposure sources, including natural sources. In Amazon region, the soils are naturally rich in mercury. Soils become more exposed to rain actions, which provide the passage of mercury to the rivers due to forest degradation. In the water, mercury suffers a methylation process changing to methyl mercury (MeHg), which stores up mainly in the fish of that area. The riverside population, who has a diet based on fish, is the main victims of the exhibition to this metal.

The toxic effects of methyl mercury have been studied and this metal is recognized as the most dangerous type of mercury to human health due to the high solubility to cross biological barriers, the capacity of bioaccumulation and the high half-life of elimination from tissues.

Among the most studied toxic effects of MeHg, there are those related to the nervous system. However the cardiovascular system has been a highlight as another metal toxicity target. In spite of the large number of studies, there is not an agreement about the cardio toxic mechanisms of mercury and many results in clinical studies are very controversial.

Some studies in mice suggest a relationship between the reduction of nitric oxide (NO) and the increase of methyl mercury exposure. Nitric oxide is a very important component in cardiovascular physiology because it maintains the vascular tone and inhibits the platelets aggregation.

On the other hand, a diet based on fish and nuts, which are common in Amazon region, provides a large quantity of selenium (Se) to the organism. This

nutrient is known by its antioxidant qualities and it is also known as an antagonist of some metal, especially mercury, toxic effects. These facts suggest that the harmful effects of MeHg may be reduced due to the presence of selenium in diet.

Therefore, the present study has estimated the relationship among mercury and selenium concentrations in blood, plasma and hair and the nitric oxide levels in plasma, in a riverside population (n=265) of Tapajós River in Pará.

INTRODUÇÃO

I - INTRODUÇÃO

Exposição ao mercúrio e suas espécies químicas

Mercúrio é um metal pesado, não essencial encontrado naturalmente no ambiente, acumulado nos solos, e também produzido durante a queima de combustíveis fósseis, incineração de lixo e garimpo. As principais formas deste elemento químico encontradas na natureza são: mercúrio metálico (Hg^0), mercúrio inorgânico (i-Hg) ou mercúrio orgânico (o-Hg) (Clarkson, 2002).

A emissão de vapores de mercúrio para o ambiente pode ocorrer proveniente de duas fontes distintas: uma fonte natural como nos casos dos vulcões, como também de fontes antropogênicas, ou seja, pela emissão de vapores de indústrias, incineração municipal, uso no garimpo, entre outros (Fitzgerald et al, 1991). Os vapores de mercúrio são estáveis e podem residir na atmosfera por até um ano, se distribuindo até regiões mais remotas. Lentamente esse mercúrio metálico é captado pela vegetação e incorporado ao solo; ou oxidado lentamente na atmosfera, gerando íons de mercúrio que retornam aos solos, rios e lagoas, trazidos pelas chuvas (Clarkson, 2002; Dorea et al, 2006).

O mercúrio metálico e seus íons destacam-se pelos danos da exposição ocupacional, através da inalação de vapores do metal. Os grupos mais expostos são os dentistas que utilizam amálgamas dentários contendo normalmente 50% de mercúrio e os garimpeiros que usam o mercúrio para amalgamação e separação do ouro (Clarkson, 2002; Chan et al, 2004).

Recentemente, com a expansão do processo de desmatamento, seja para cultivo de lavouras ou comercialização de madeira na região amazônica, o mercúrio até então contido naturalmente nos solos e protegido pelas florestas,

passou a ser disponibilizado e levado para dentro de rios e lagos sob ação das chuvas e do processo de erosão. Uma vez no ambiente aquático, o metal se deposita no fundo dos rios e lagos onde bactérias e fungos residentes promovem sua metilação, gerando metil-mercúrio (MeHg), a mais importante espécie em termos de toxicidade e efeitos danosos á saúde humana, decorrentes de exposição ambiental (Dorea et al, 2006).

Como conseqüência, peixes e alimentos provenientes desse meio acumulam MeHg tornando-se as principais fontes de exposição ambiental para o homem (Environ Prot Agency, 2001).

A cadeia alimentar tem enorme influência sobre os níveis de MeHg em peixes devido a sua característica cumulativa, ou seja, peixes carnívoros maiores, que se alimentam de peixes menores, acumulam muito mais o organometal que peixes menores herbívoros (Harris et al, 2006).

As populações residentes às margens de rios e/ou baías contaminadas são geralmente as mais expostas, devido ao fato de terem sua alimentação baseada no consumo de peixes, somando-se a isso a falta de instrução, informação e assistência médica, precariedade no transporte e afastamento de centros urbanos.

Exposição ao metilmercúrio no Brasil

O crescimento acentuado da produção brasileira de ouro nos últimos anos tem colaborado para uma alteração marcante no padrão de morbidade na região Amazônica.

A participação da atividade garimpeira de ouro na economia da região do rio Tapajós no Pará teve início no final da década de 50, quando foi descoberta

a ocorrência do metal no rio de Tropas (afluente do Tapajós). O mercúrio metálico era usado no garimpo para formar amálgamas com ouro e assim facilitar a identificação. O problema é que em seguida esse amálgama era queimado para purificar o ouro, causando liberação de mercúrio para a atmosfera. A quantidade estimada de mercúrio liberada para o ambiente na região Amazônica desde aproximadamente 1970 até o final dos anos 90 seja de duas mil toneladas (Malm, 1998). O garimpo então se revelou como um assunto polêmico, em função de diversas questões sociais, políticas, econômicas e dos problemas ambientais envolvidos (Brabo et al, 1999).

Entretanto em 2001 um estudo realizado em amostras de água do rio Negro, revelou altos teores de mercúrio em regiões onde o extrativismo mineral era raro e não justificava a ocorrência do metal, e sugerindo que o desmatamento local poderia ser a causa da mobilização do mercúrio acumulado durante milhares de anos nos solos argilosos e profundos que predominam na região (Fadini et al, 2001). A partir de então um número cada vez maior de pesquisas foram sendo desenvolvidas na região amazônica, na tentativa de melhor compreender o ciclo biogeoquímico deste metal e conseqüentemente as implicações a saúde da população. Harada e colaboradores (1994) mostraram que os níveis de mercúrio no cabelo da população da região do rio Tapajós, especificamente nas comunidades próximas a cidade de Itaituba variavam em média de 14.1 a 20.8 µg/g com valores encontrados de até 62.9 µg/g. Valores elevados se comparados aos níveis tidos como de população não exposta que são inferiores que 5 µg/g.

Toxicocinética do metilmercúrio (MeHg) e seus impactos à saúde humana.

Quase 100% do mercúrio encontrado nos peixes está na forma de metilmercúrio (Cabanero et al, 2004); que é reconhecido como um poluente ambiental de grande relevância devido aos perigos que representa para saúde humana, devido principalmente a sua propriedade lipofílica, o que permite que atravesse as barreiras biológicas com facilidade, além de se bioacumular, permanecendo longos períodos no organismo humano (Tão et al, 1998).

Cerca de 95% do MeHg ingerido é absorvido rapidamente pelo trato gastrintestinal, alcançando a corrente sanguínea onde se liga a grupos sulfidrilas das proteínas eritrocitárias, sendo distribuídos para os tecidos em aproximadamente 30 horas (Clarkson, 2002), acumulando e provocando efeitos tóxicos bastante pronunciados, principalmente no sistema nervoso central e cardiovascular (Virtanen et al, 2007). Capaz de atravessar a barreira placentária e entrar na circulação fetal (Castoldi et al, 2003). A meia-vida biológica do MeHg no corpo humano é da ordem de 50 dias (Nacional Res Conc, 2000). O metilmercúrio é metabolizado a mercúrio inorgânico antes de sua eliminação via fezes, entretanto essa conversão é bastante lenta. Junto a isso, o fato do corpo humano não possuir outra via para eliminar ativamente o metal, contribui para que ele se acumule continuamente durante o tempo, mesmo que a exposição não seja tão elevada, mas contínua (Dorea et al, 2006).

Metilmercúrio se acumula também nas unhas, entretanto esse tipo de amostra ainda não é aceita como marcador de exposição.

Amostras de sangue e cabelo são aceitas na literatura como marcadores de exposição ao metal, com a finalidade de prevenir ou diagnosticar o grau de

exposição, bem como possíveis efeitos danosos à saúde. Amostras de cabelo são consideradas de grande importância por sugerir o histórico da exposição, altamente correlacionado com os níveis sanguíneos, atuando de forma complementar. As concentrações de metilmercúrio no cabelo são cerca de 250 maiores que as encontradas no sangue, e o valor de referência é de 5µg/g de cabelo. Concentrações de referência de mercúrio no sangue total são tipicamente inferiores a 5,0 µg/L Hg em adultos (WHO,1990; NCCLS, 1997).

O efeito tóxico do MeHg mais documentado é no sistema nervoso central. O tecido cerebral é bastante vulnerável a toxicidade do metilmercúrio, levando a sérios danos no desenvolvimento neurológico. A exposição de adultos a altos níveis de MeHg também resulta em extensivos danos neurológicos a até a morte (Counter et al, 2004; Nuttall, 2004).

Um dos casos mais conhecidos de intoxicação por metilmercúrio ocorreu em Minamata no Japão em 1956. Após a descarga de grande quantidade de mercúrio inorgânico na Baía de Yatsushiro por uma indústria de polímeros. Os micro-organismos presentes na baía metilaram o mercúrio inorgânico, resultando em um acúmulo de MeHg na fauna local. Poucos anos após o incidente, sintomas neurológicos foram observados na população local que se alimentava dos peixes da baía (Harada, 1994).

Outro caso relevante ocorreu no Iraque em 1971, onde uma plantação de grãos foi contaminada pelo uso de um fungicida contendo mercúrio, contaminando todos os grãos e expondo assim as pessoas que ingeriram alimentos a base desses grãos. Esse incidente causou a hospitalização de 6500 indivíduos e morte de quase 500 (Bakir et al, 1973).

Entretanto, recentemente tem sido evidenciado que a exposição ao

metilmercúrio promove efeitos tóxicos também no sistema cardiovascular, onde os sintomas geralmente são sub-clínicos, dificultando uma intervenção preventiva ou terapêutica e se tornando um risco potencial (Virtanen et al, 2007).

Em 1984, um grupo de pesquisadores avaliou as principais causas de óbito dessas pessoas expostas ao metilmercúrio em Minamata, e observou que cerca de 14,1% das mortes, entre 1422 investigadas, ocorreram por doenças cardiovasculares, terceira maior causa de mortes (Tamashiro et al, 1984).

Intoxicação por mercúrio como um fator de aumento do risco cardiovascular

A relação entre os níveis de mercúrio nos marcadores biológicos de exposição e o risco aumentado de doenças cardiovasculares, têm se tornado alvo de vários estudos.

Matsuo e colaboradores (1989) determinaram os níveis de mercúrio em amostras de coração após autópsia em 46 japoneses expostos ao metal. Os níveis de mercúrio encontrados neste tecido foram similares aos encontrados no cérebro dos mesmos indivíduos e aproximadamente 80% do metal estava presente na forma de metilmercúrio.

A implicação a saúde do acúmulo de mercúrio no coração não está ainda totalmente caracterizado, e os mecanismos da cardiotoxicidade ainda não foram elucidados. Em estudo recentemente realizado, foram verificados níveis 15% superiores de mercúrio nas unhas dos pés de 684 pessoas com prévio diagnóstico de infarto do miocárdio em comparação a 724 voluntários sadios (Guallar et al, 2002). Em estudos realizados em um grupo de finlandeses

mostrou que níveis altos de mercúrio no cabelo estavam associados à progressão acelerada de arteriosclerose da carótida (Salonen et al, 2000; Salonen et al, 1995). Entretanto, estudos realizados em 1987, nos Estados, com 51.529 homens de idades entre 40 e 75 anos, não mostraram nenhuma relação entre os níveis de mercúrio nas unhas e a incidência de doenças cardiovasculares (Yoshizawa et al, 2002).

Apesar do crescente número de publicações tentando correlacionar os níveis de mercúrio no corpo com a incidência de doenças cardiovasculares, os resultados muitas vezes têm sido conflitantes, muitas vezes devido ao uso de amostra não aceitas como marcadores de exposição.

Intoxicação pelo mercúrio como um fator de aumento do risco cardiovascular por possíveis interações com o sistema do Óxido Nítrico.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula altamente difusível cuja estabilidade é limitada pela baixa meia-vida biológica (apenas alguns segundos), além de participar de uma variedade de reações químicas com metais, grupos tióis de proteínas e espécies reativas de oxigênio (Beckman et al, 1996).

O NO é sintetizado a partir da L-arginina através da atividade catalítica de três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) presente em vários tecidos. As três isoformas da NOS são: neuronal (nNOS ou NOSI), induzida (iNOS ou NOSII) e endotelial (eNOS ou NOSIII) (30). Essas três isoenzimas apresentam grande homologia estrutural, podendo ser divididas em dois domínios: um redutor, na parte C-terminal, e outro oxidante, na parte N-terminal. No domínio redutor estão os sítios de ligação para o nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADPH) e os cofatores flavina-adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina

mononucleotídeo (FMN), os quais transferem elétrons para o grupo heme, localizado no domínio oxidante, onde também se ligam o tetraidrobiopterina (BH₄) e o substrato L-Arg (Andrew et al, 1999).

O NO participa de vários processos fisiológicos, como relaxamento da musculatura lisa vascular, inibição do recrutamento, adesão e agregação plaquetária, neurotransmissão no sistema nervoso central e periférico, e mecanismos de defesa, participando nas respostas imunológicas e no processo inflamatório (Cooke et al, 1997; Moncada et al, 2002). Com essas propriedades e outras mais, o NO desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase cardiovascular, regulando o tônus vascular, fluxo sanguíneo regional e a pressão sanguínea sistêmica, além de conferir propriedades trombo-resistente e ateroprotetora ao endotélio. Assim, prejuízos na sua produção ou biodisponibilidade contribuem para o desenvolvimento de vários estados fisiopatológicos, como a predisposição à hipertensão, aterosclerose, doença coronariana, trombose, vaso espasmos, entre outras (Moncada et al, 1993; Jeerooburkhan et al, 2001; Wang et al, 1997).

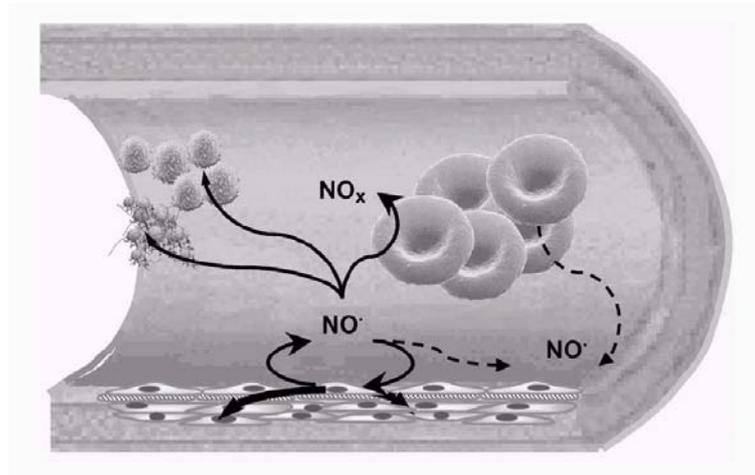


Figura 1 – NO circulante no endotélio. Desde que o NO é liberado ele exerce seus efeitos sobre as células da parede vascular e também no lúmen, sendo que uma parte significativa do NO produzido pelo endotélio age diretamente sobre o sangue. O NO é então rapidamente metabolizado pela hemoglobina presente nos eritrócitos, parte do NO bioativo é conservado no sangue agindo diretamente sobre células sanguíneas incluindo plaquetas, leucócitos e eritrócitos, sofrendo reações oxidativas e nitrosativas no plasma e eritrócitos, sendo transportado através dos vasos (Rassaf et al, 2004).

A curta meia-vida biológica e as baixas concentrações plasmáticas dificultam a avaliação quantitativa da produção de NO *in vivo* pelos tecidos. Por este motivo, quantificações de espécies relacionadas ao NO têm sido usadas para avaliar sua produção. Entre elas, a quantificação de nitritos e nitratos plasmáticos, principais produtos da oxidação do NO (NOx), são as mais comumente utilizadas (Davis et al, 2001). Vale ainda ressaltar que as determinações de NOx após 12 horas de jejum refletem a produção endógena de NO, independentemente de fatores dietéticos (Wang et al, 1997; Rosselli et al, 1995; Rhodes et al, 1995; Castillo et al, 1996; Hibbs et al, 1992; Bailys et al, 1998).

Ao ser liberado no endotélio vascular o NO pode se difundir através das células musculares lisas levando a vasodilatação, e na luz vascular pode reagir com a oxihemoglobina dos eritrócitos, se transformado em nitrito (biologicamente ativo), que em seguida é oxidado a nitrato, um composto biologicamente inativo (Figura 2) (Moncada et al, 2002; Cosby et al, 2003; Lauer et al, 2002).

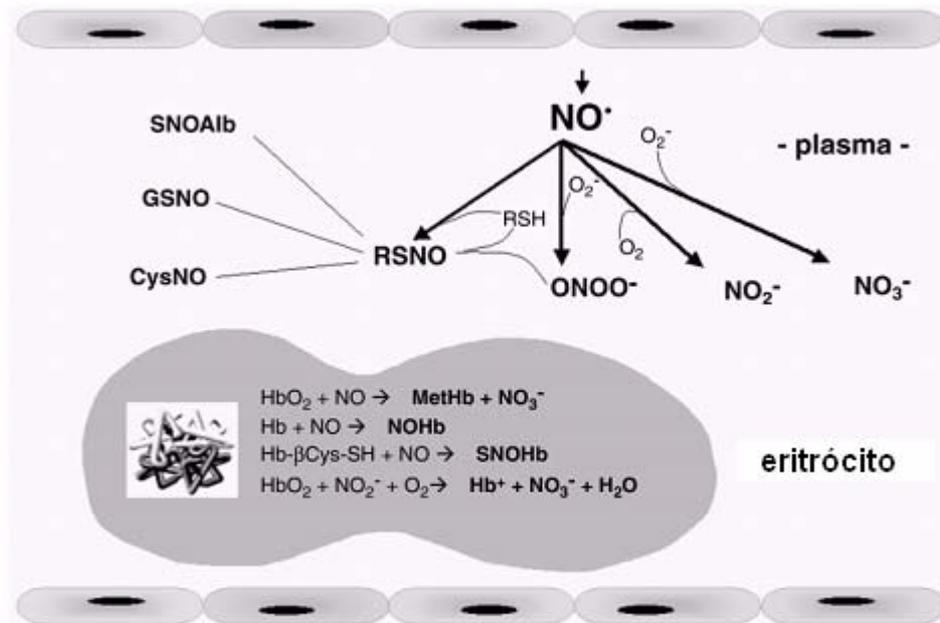


Figura 2 – Potenciais vias de decomposição do NO no sangue humano. No plasma o NO pode reagir com oxigênio molecular, formando nitrito (NO₂⁻) ou peroxinitrito (ONOO⁻), com subsequente decomposição do nitrito a nitrato (NO₃⁻). Uma alternativa é o grupo nitrosônio do NO reagir com tióis formando nitrosotióis (RSNO). Além disso o NO pode reagir com a oxihemoglobina eritrocitária formando metahemoglobina (metHb) e NO₃⁻, ou com a deoxihemoglobina resultando na nitrosilhemoglobina (NOHb), ou ainda com o resíduo Cys93 da subunidade β da hemoglobina. E ainda, o NO₂⁻ plasmático pode entrar em contato com os eritrócitos, sofrendo uma oxidação dependente de hemoglobina, que resulta na formação de NO₃⁻. SNOAlb, S-nitrosilalbumina; GSNO, S-nitrosoglutationa; CysNO, S-nitrosocisteína, RSH, grupo sulfidrila (Lauer et al, 2002).

Alguns pesquisadores têm mostrado que a exposição a metais, como o mercúrio, causa uma alteração na síntese e disponibilidade de óxido nítrico.

Kishimoto e colaboradores (1995) usaram amostras de células do endotélio vascular umbilical humanas e observaram que a exposição (*in vitro*) provocou uma diminuição da atividade da NOS e conseqüente redução na síntese do NO.

Kuo e colaboradores (2002) usando amostra de neutrófilos isolados de rato demonstraram ocorrer uma diminuição na síntese de óxido nítrico pela eNOS, quando do tratamento (*in vitro*) com metil-mercúrio.

Entretanto apesar das evidências, nenhum estudo foi realizado para avaliar os reais efeitos do metil-mercúrio sobre a biodisponibilidade do óxido nítrico em humanos expostos a este organometal.

Em humanos, embora não exista evidência comprovada de que a hipertensão arterial seja devida especificamente a um comprometimento do sistema NO, há vários indícios de que a redução da biodisponibilidade de NO pode causar aumento da pressão sanguínea (Thomas et al, 2001). Foi demonstrado que a administração de inibidores da eNOS provoca elevação da pressão sanguínea (Sander et al, 1999), indicando uma ação importante do NO na manutenção do tônus vascular.

Selênio: vias metabólicas e efeitos no corpo humano

O selênio (Se) é um micronutriente essencial para o organismo humano, já que participa e regula várias funções biológicas e bioquímicas. A ingestão diária recomendada de selênio é de 0,1 – 0,3 mg/Kg. No Brasil este elemento químico essencial é encontrado em grandes quantidades nas castanhas do Pará

(> 50 µg/g). O Se pode ser encontrado em alimentos na forma inorgânica, como selenito e selenato, e principalmente em formas orgânicas, como selenometionina (SeMet) e selenocisteína (SeCys). Tanto as espécies inorgânicas quanto às orgânicas são usadas como fonte nutricional (Iscioglu et al, 2004).

Após a ingestão e absorção, o selenito (SeO_3^{2-}) adentra os eritrócitos onde é reduzido a Se^{2-} pela glutathione peroxidase (GSH). Em seguida o Se^{2-} sai das células vermelhas, e se liga a albumina para transporte até o fígado, onde é incorporado a selenoproteínas ou excretado quando em excesso (Sandholm, 1973; Burk et al, 1993). Outra possibilidade é o selenito ser oxidado a selenato (SeO_4^{2-}). O selenato ao contrário do selenito não penetra nos eritrócitos, mas permanece no plasma de forma inalterada partindo então para o fígado ou sendo excretado na urina (Suzuki et al, 2002).

As espécies orgânicas passam por uma clivagem da ligação carbono-selênio (C-Se) por ação de β -liases, dando origem ao Se^{2-} , que segue então para síntese de selenoproteínas ou quando em excesso é excretado na forma de metabólitos metilados na urina, sendo o principal metabólito um selenoaçúcar contendo um grupo selenometil (Ogra et al, 2002).

No tecido de mamíferos, a forma química do selênio que predomina é selenocisteína, encontrada em selenoproteínas como glutathione peroxidase e selenoproteína-P (Forstrom et al, 1978; Montsenbocker et al, 1982).

São denominadas selenoproteínas aquelas proteínas que contém na sua estrutura Se ligado a um resíduo de cisteína (Cys), mais especificamente em seu sítio ativo, participando de reações de óxido-redução. Entretanto o Se só é incorporado se estiver na sua forma elementar. Neste sentido, toda forma

química de selênio ingerida é transformada em um intermediário comum (Se^{-2}), para que então seja incorporado às selenoproteínas (Suzuki et al, 2002). No caso de selenometionina (SeMet), pode ocorrer dois processos distintos, um em que o Se é dissociado do complexo SeMet e incorporado à selenoproteína e outro no qual os complexos (SeMet) intactos são inseridos na estrutura das proteínas e nesse caso a denominação muda de selenoproteínas para proteínas que contêm selênio, as quais não possuem função biológica específica relatada, exceto como reserva de selênio no organismo (Butler et al, 1989).

Quase todo o selênio no organismo de mamíferos se encontra na forma de selenoproteínas. Já são conhecidas mais de 20 selenoproteínas, com ou sem função conhecida, e algumas têm seus níveis alterados pela concentração de selênio presente na dieta (Watanabe, 2002). Uma vez no soro, o Se se liga principalmente a três proteínas: Selenoproteína P (SeP), glutathione peroxidase extra-celular (eGPx) e albumina (Kryukov et al, 2003). A SeP é sintetizada no fígado e secretada para o plasma. Acredite-se que a SeP, além de anti-oxidante também atue como um transportador de selênio até os rins onde é degradado e o selênio usado para a síntese de eGPx (Suzuki et al, 1999; Saito et al, 1999; Nakane et al, 1998).

O selênio exerce funções de grande importância no organismo tais como proteção de membranas contra danos oxidativos, regulação do metabolismo da glândula tireóide, presente no sítio ativo de selenoproteínas com função anti-oxidante, interação com metais pesados como arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio, atuando de forma antagônica, atenuando sua toxicidade, dentre outras (Iscioglu et al, 2004; Falnoga et al, 2000).

Há muito tempo vem sendo pesquisada a interação entre mercúrio (Hg) e

selênio. Em 1967 já era reportada uma atenuação da toxicidade de mercúrio na presença selênio (Parizek et al, 1967). Dentre as vítimas do desastre de Minamata, foram encontradas altas concentrações de Hg e Se nos tecidos dos corpos. Em 1972 mais um estudo associava claramente a diminuição dos efeitos tóxicos do metilmercúrio (MeHg) à presença de selênio (Ganther et al, 1972). Em autópsia de mineradores expostos a Hg, os resultados mostraram que Se e Hg se co-acumulam nos tecidos (Kosta et al, 1975).

Com base nos resultados desses e outros estudos iniciais, várias pesquisas vêm sendo realizadas na tentativa de elucidar a interação mútua entre esses dois elementos (Watanabe, 2002).

Interação entre selênio e mercúrio

Três formas principais de mercúrio têm relevância em humanos: metilmercúrio (MeHg), mercúrio elementar (Hg^0 , vapor de mercúrio) e sais de mercúrio inorgânico (I-Hg). Tanto mercúrio elementar quanto inorgânico, têm seus riscos associados à exposição ocupacional, enquanto a exposição ambiental ocorre em geral nas populações que tem em suas dietas o consumo considerável de peixe .

A forma de interação entre Se e Hg varia de acordo com as formas químicas de ambos elementos, sendo o estudo da interação entre MeHg e Se, o mais relevante para saúde humana (Watanabe, 2002).

Ganther, em 1972, foi o primeiro a reportar a interação entre MeHg e Se (Ganther et al, 1972). Seus resultados mostraram claramente uma diminuição da mortalidade induzida pelo organometal. Posteriormente, verificou-se também diminuição dos efeitos neurotóxicos (Imura, 1986). Quando ratos recebem uma

dieta suplementada com selênio, os efeitos comportamentais induzidos pelo metilmercúrio são da mesma maneira atenuados (Fredriksson et al, 1993). Um estudo em camundongos sugeriu uma diminuição de alguns efeitos tóxicos do metilmercúrio (fetotoxicidade, neurotoxicidade e alterações no desenvolvimento) quando selênio era co-administrado aos animais (Nobunaga et al, 1979).

O mecanismo pelo qual o selênio atua de forma a diminuir os efeitos tóxicos de metais pesados, e nesse caso em especial a forma orgânica de mercúrio, metilmercúrio, continua sendo investigado.

Alguns estudos realizados indicaram um possível mecanismo onde o MeHg é demetilado pela ação de espécies reativas de oxigênio, gerando mercúrio inorgânico que se liga ao Se^{2-} formando complexos inertes. Desta forma é promovida uma detoxificação do organismo exposto ao mercúrio (Hirayama et al, 2001; Gregus et al, 2001).

Uma vez que a principal via de exposição ao metilmercúrio ocorre pelo consumo de peixes, que também são considerados como uma fonte nutricional de selênio bastante importante, o selênio pode atuar de forma antagônica a toxicidade do mercúrio, protegendo o sistema cardiovascular, pelo menos em parte, de populações ribeirinhas expostas ao mercúrio.

OBJETIVOS

II - OBJETIVOS

Foi objetivo do presente estudo:

- Quantificar o mercúrio nas amostras de sangue total, plasma e cabelo;
- Quantificar o selênio nas amostras de sangue total e plasma;
- Quantificar o nitrito plasmático;
- Avaliar os efeitos do mercúrio sobre a biodisponibilidade de óxido nítrico;
- Avaliar a influência dos níveis de selênio sobre a toxicidade do

metilmercúrio, quanto a biodisponibilidade de NO, na tentativa de compreender o porque dessas populações ribeirinhas não apresentarem efeitos adversos mesmo com elevados níveis de mercúrio no sangue.

MATERIAL E MÉTODOS

III - MATERIAL E MÉTODOS

III.a - Efeitos da intoxicação ambiental por metilmercúrio sobre a biodisponibilidade sistêmica de NO

Etapa 1. Seleção dos voluntários

Foram coletadas amostras de sangue, plasma e cabelo, de 265 indivíduos adultos com idades entre 15 e 84 anos, residentes em duas comunidades ribeirinhas, as margens do rio Tapajós, região de Itaituba no estado do Pará. Expostos a metilmercúrio através da alimentação baseada no consumo de peixes. Essa população foi estudada anteriormente por pesquisadores da Universidade de Quebec, no Canadá, chefiados pela Dra. Donna Mergler. Os resultados demonstraram um grande número de pessoas nesta região com elevados níveis de mercúrio no cabelo e sangue (Dolbec et al, 2001)

Após o esclarecimento detalhado sobre o projeto, e a assinatura do termo de consentimento informado pelo voluntário; foram coletados 10 mL de sangue venoso em tubos livre de metais (BD, trace metals free) contendo heparina sódica como anticoagulante.

As amostras foram utilizadas para determinação das concentrações de mercúrio e selênio no sangue total e plasma, bem como para determinação das concentrações de nitritos plasmáticos, conforme descrito abaixo.

As amostras de cabelo foram coletadas da região da nuca do voluntário (~100mg) e armazenadas em sacos plásticos previamente descontaminados para metais.

Foi distribuído um questionário contendo questões sobre variáveis: idade,

sexo, peso, situação de saúde, história familiar de doença cardiovascular, informações sobre fatores de risco (tabagismo, hipertensão, hipercolesterolemia, uso de bebidas alcoólicas, hábitos alimentares e nível de atividade física), tempo de residência no local para conhecimento do tempo de exposição. De todos os voluntários foi aferida pressão antes e depois de entrevista.

Etapa 2. Estudo das concentrações de nitritos para avaliação da biodisponibilidade sistêmica de NO.

As amostras de plasma foram usadas para determinação dos níveis de nitrito.

Etapa 3. Estudo das concentrações de mercúrio e selênio nas amostras de plasma

As amostras de sangue total e plasma foram usadas para determinação das concentrações de mercúrio total e selênio. Nas amostras de cabelo foram determinadas concentrações de mercúrio total, inorgânico e orgânico.

III.b - DETALHAMENTO DOS MÉTODOS EMPREGADOS

III.b.1 - Determinação de mercúrio em sangue total e plasma.

Instrumentação e acessórios

As determinações de mercúrio e selênio foram realizadas por meio de espectrometria de absorção atômica (CV AAS) e de massas com plasma acoplado (ICP-MS), segundo as metodologias propostas por Barbosa Jr e colaboradores (2004), Zanão e colaboradores (2002) e Palmer e colaboradores (2006).

Foi utilizado para tal um espectrômetro de massas com plasma acoplado (ICP-MS) da Perkin Elmer modelo Elan DRC II e um espectrômetro de absorção atômica Perkin Elmer modelo FIMS 400.

Reagentes e soluções

Água deionizada de alta pureza (resistividade 18,2 M Ω .cm) obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore®) foi utilizada em todo o trabalho. Ácido nítrico foi destilado em temperatura inferior à de ebulição, empregando-se destilador de quartzo da Kürner Analystechnik para eliminação de impurezas.

Todas as soluções foram armazenadas em frascos de polietileno. Frascos de plástico, e materiais de vidro foram mergulhados em solução contendo 20% v/v HNO₃ por 24 h, lavados 5 vezes com água Milli-Q e secos em capela de fluxo laminar classe 100. Todas as operações para preparo das soluções de referência de mercúrio foram realizadas em sala limpa classe 10000.

Solução estoque contendo 1,0 gL⁻¹ de Hg e de Se (Perkin-Elmer, Inc.) padronizada pela “National Institutes of Standards and Technology” (NIST) foi utilizada para calibração dos espectrômetros.

III.b.2 - Determinação de mercúrio em cabelo

As amostras de cabelo foram coletadas da região occipital. As análises foram feitas por meio de espectroscopia de absorção atômica com vapor frio e as amostras foram anteriormente digeridas com ácido nítrico, seguida de ácido sulfúrico, permanganato de potássio e cloridrato de hidroxilamina.

III.b.3 - Materiais de referência para controle dos resultados de mercúrio e selênio em sangue total e plasma

Materiais de referência certificados de sangue provenientes da National Institute of Standards and Technology (NIST) nos Estados Unidos (NIST 966 MeHg e Hg in bovine blood) e materiais de referência de sangue provenientes do Departamento de Saúde Pública do Estado de Nova Iorque, nos Estados Unidos, contendo mercúrio e selênio foram analisados previamente e posteriormente a análise de um grupo de 20 amostras das usadas no estudo, para controle dos resultados obtidos.

III.b.4 - Determinação das concentrações plasmáticas de nitritos:

Os níveis plasmáticos de espécies relacionadas ao NO refletem a atividade da eNOS. O NO participa de várias e complexas reações químicas no organismo. Sua curta meia-vida biológica e as suas pequenas concentrações dificultam a avaliação quantitativa da produção *in vivo* de NO pelos tecidos. Por este motivo, quantificações de espécies relacionadas ao NO têm sido usadas para avaliar a produção de NO. Entre elas, as concentrações plasmáticas dos principais produtos da oxidação do NO (nitritos e nitratos) são mais comumente utilizadas.

As concentrações de nitrito foram determinadas, sempre em triplicata, pelo método da quimioluminescência, que é um dos métodos mais simples, sensíveis e precisos disponíveis para medir NO. Foi utilizado um analisador de NO (Sievers Model 280 NO Analyzer - Boulder, CO, EUA), o qual permite medir NO em quantidades tão pequenas quanto 1 pmol (Gladwin et al, 2000).

As amostras de plasma previamente desproteinizadas (50 µL), foram

injetadas em frasco contendo uma solução redutora (5 mL de ácido acético glacial, 2mL de H₂O, 50 mg de iodeto de potássio e um pequeno cristal de I₂) que converte os nitritos em NO gás. O frasco é conectado a um fluxo contínuo do gás inerte (Nitrogênio) que passa através da solução, “carregando” consigo o NO liberado em direção ao analisador de NO. Este quantifica o NO liberado, que tem correspondência estequiométrica com a quantidade de nitritos presentes na amostra (Gladwin et al, 2000).

III.c – Análise estatística

Para todos os estudos de correlação foi aplicada correlação de Pearson após os dados serem normalizados. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

IV – RESULTADOS

Foram analisadas amostras de sangue total, plasma e cabelo de 265 indivíduos com idade entre 15 e 84 anos (média 42 anos), residentes em comunidades ribeirinhas situadas as margens do rio Tapajós, no estado do Pará.

Os valores de mercúrio total nas amostras de sangue dos indivíduos estudados variaram de 1,7 µg/L a 288,9 µg/L, com média de 50,9 µg/L e mediana de 41,8 µg/L.

Os valores de mercúrio total no plasma variaram de 0,2 µg/L a 40,0 µg/L, com média de 7,86 µg/L e mediana de 6,20 µg/L.

Nas amostras de cabelo, os níveis de mercúrio total variaram de 1,15 µg/g a 62,39 µg/g, com média de 14,77 µg/g e mediana de 11,53 µg/g.

A razão mercúrio plasma / mercúrio sangue apresentou variação de 0,010 a 0,610, com média de 0,162 e mediana 0,170.

As concentrações de selênio no sangue variaram de 103,0 µg/L a 1474,0 µg/L, média de 286,2 µg/L e mediana de 221,5 µg/L.

No plasma os níveis de selênio variaram de 6,2 µg/L a 749,2 µg/L, com média de 167,6 µg/L e mediana de 133,7 µg/L.

A razão mercúrio sangue / selênio sangue apresentou variação de 0,010 a 1,470, com média de 0,215 e mediana de 0,160.

A pressão arterial dos indivíduos foi aferida e apresentou as seguintes variações: pressão arterial sistólica (PAS) entre 83 mmHg e 221 mmHg, média de 121 mmHg e mediana de 118 mmHg; enquanto a pressão arterial diastólica variou entre 43 mmHg e 114 mmHg, com média de 72 mmHg e mediana de 72 mmHg.

A Tabela 1 sumariza os valores encontrados para cada parâmetro avaliado

nesse estudo, desde características clínicas como pressão arterial sistólica e diastólicas; até valores dos analitos dosados em sangue total, plasma e cabelo. Os valores são apresentados na forma de média \pm desvio padrão, mediana, valores mínimos e máximos. Também são discriminados entre homens (n=129), mulheres (n=136) e os indivíduos como um todo (n=265).

A Tabela 2 sintetiza a análise estatística de alguns parâmetros confrontados, e os respectivos coeficientes de correlação de Pearson e os valores para p .

Os gráficos mostram os parâmetros analisados que apresentaram correlações (Pearson) relevantes.

Tabela 1. Estatística descritiva das variáveis em estudo.

Categorias	Média \pm D.P.			Mediana			Mínimo			Máximo		
	T	H	M	T	H	M	T	H	M	T	H	M
Idade (anos)	42 \pm 17	45 \pm 17	39 \pm 16	40	46	38	15	15	15	84	81	84
PAS (mmHg)	121 \pm 21	127 \pm 20	115 \pm 20	118	122	111	83	86	83	221	221	203
PAD (mmHg)	72 \pm 11	72 \pm 11	72 \pm 11	72	72	72	43	43	45	114	114	103
Nitrito (η M)	275,4 \pm 194,0	263,4 \pm 225,9	286,6 \pm 157,9	250,5	234,7	275,4	44,0	44,0	99,9	2340,0	2340,0	1256,0
SeS (μ g/L)	286,2 \pm 203,8	277,2 \pm 194,7	294,7 \pm 212,5	221,5	218,6	229,0	103,3	131,2	103,3	1474,0	1474,0	1385,0
SeP (μ g/L)	167,6 \pm 110,1	166,4 \pm 100,0	168,6 \pm 119,1	133,7	133,7	133,3	6,2	53,6	6,2	749,2	658,8	749,2
SeE (μ g/L)	118,6 \pm 110,0	110,8 \pm 112,6	126,1 \pm 107,3	91,4	82,7	99,5	0,9	0,9	3,9	815,2	815,2	696,5
SeP/SeS	0,609 \pm 0,141	0,627 \pm 0,143	0,591 \pm 0,137	0,600	0,610	0,580	0,040	0,320	0,040	1,000	1,000	0,960
HgS (μ g/L)	50,9 \pm 38,4	59,1 \pm 43,9	43,1 \pm 30,6	41,8	43,7	38,6	1,7	3,5	1,7	288,9	288,9	159,4
HgP (μ g/L)	7,9 \pm 7,04	8,9 \pm 7,84	6,8 \pm 6,03	6,2	7,2	5,2	0,2	0,2	0,2	40,0	40,0	25,9
HgP/HgS	0,162 \pm 0,103	0,158 \pm 0,101	0,166 \pm 0,106	0,170	0,170	0,180	0,010	0,010	0,010	0,610	0,610	0,470
HgC (μ g/g)	14,8 \pm 11,05	13,5 \pm 17,01	12,7 \pm 9,46	11,5	13,5	10,4	1,2	2,2	1,2	62,4	62,4	57,9
I-HgC (μ g/g)	2,1 \pm 1,57	2,3 \pm 1,74	1,8 \pm 1,34	1,6	1,7	1,6	0,0	0,2	0,0	7,2	7,2	5,5
O-HgC (μ g/g)	12,7 \pm 9,64	14,7 \pm 10,59	10,8 \pm 8,25	9,8	11,1	8,7	1,2	1,9	1,2	56,0	56,0	52,4
%O-HgC (μ g/g)	0,86 \pm 0,05	0,86 \pm 0,04	0,86 \pm 0,05	0,85	0,85	0,85	0,72	0,77	0,72	1,00	0,95	1,00
HgE (μ g/L)	43,0 \pm 33,25	50,2 \pm 37,79	36,3 \pm 26,69	35,3	38,6	29,5	1,5	3,3	1,5	248,9	248,9	142,6
HgS/SeS	0,215 \pm 0,18	0,255 \pm 0,21	0,178 \pm 0,14	0,160	0,190	0,130	0,010	0,020	0,010	1,470	1,470	0,760
HgS/SeP	0,375 \pm 0,393	0,422 \pm 0,362	0,330 \pm 0,416	0,280	0,330	0,235	0,010	0,030	0,010	4,320	2,880	4,320
HgP/SeS	0,062 \pm 0,07	0,061 \pm 0,06	0,062 \pm 0,08	0,041	0,054	0,035	0,0004	0,0004	0,0004	0,837	0,398	0,837

PAS = pressão arterial sistólica; PAD = pressão arterial diastólica; HgS = mercúrio no sangue; HgP = mercúrio no plasma; HgE = mercúrio nos eritrócitos; I-HgC = mercúrio inorgânico no cabelo; O-HgC = mercúrio orgânico no cabelo; SeS = selênio no sangue; SeP = selênio no plasma. T=todos; H=homens; M=mulheres; DP= desvio padrão. Valores de nitrito plasmático.

Tabela 2. Parâmetros avaliados conforme correlação de Pearson.

Parâmetros (normalizados)	Correlação <i>r</i> (Pearson)	Relevância <i>p</i>
Nitrito (ηM) vs HgS (μg/L)	0,012	0,8500
Nitrito (ηM) vs HgP (μg/L)	-0,090	0,1440
Nitrito (ηM) vs HgE (μg/L)	0,033	0,5966
Nitrito (ηM) vs HgP/HgS	-0,134	0,0291
Nitrito (ηM) vs SeS (μg/L)	-0,077	0,2124
Nitrito (ηM) vs SeP (μg/L)	-0,101	0,1025
Nitrito (ηM) vs SeE (μg/L)	0,004	0,9427
Nitrito (ηM) vs SeP/SeS	-0,040	0,5155
HgS (μg/L) vs SeS (μg/L)	0,1672	0,0064
HgP (μg/L) vs SeP (μg/L)	-0,023	0,7119
Nitrito (ηM) vs HgS/SeS	0,058	0,3495
Nitrito (ηM) vs HgP/SeP	-0,134	0,0288
Nitrito (ηM) vs HgS/SeP	0,065	0,2899

HgS = mercúrio no sangue; HgP = mercúrio no plasma; HgE = mercúrio nos eritrócitos; I-HgC = mercúrio inorgânico no cabelo; O-HgC = mercúrio orgânico no cabelo; SeS = selênio no sangue; SeP = selênio no plasma. T = todos; H = homens; M = mulheres; DP = desvio padrão. Valores de nitrito plasmático.

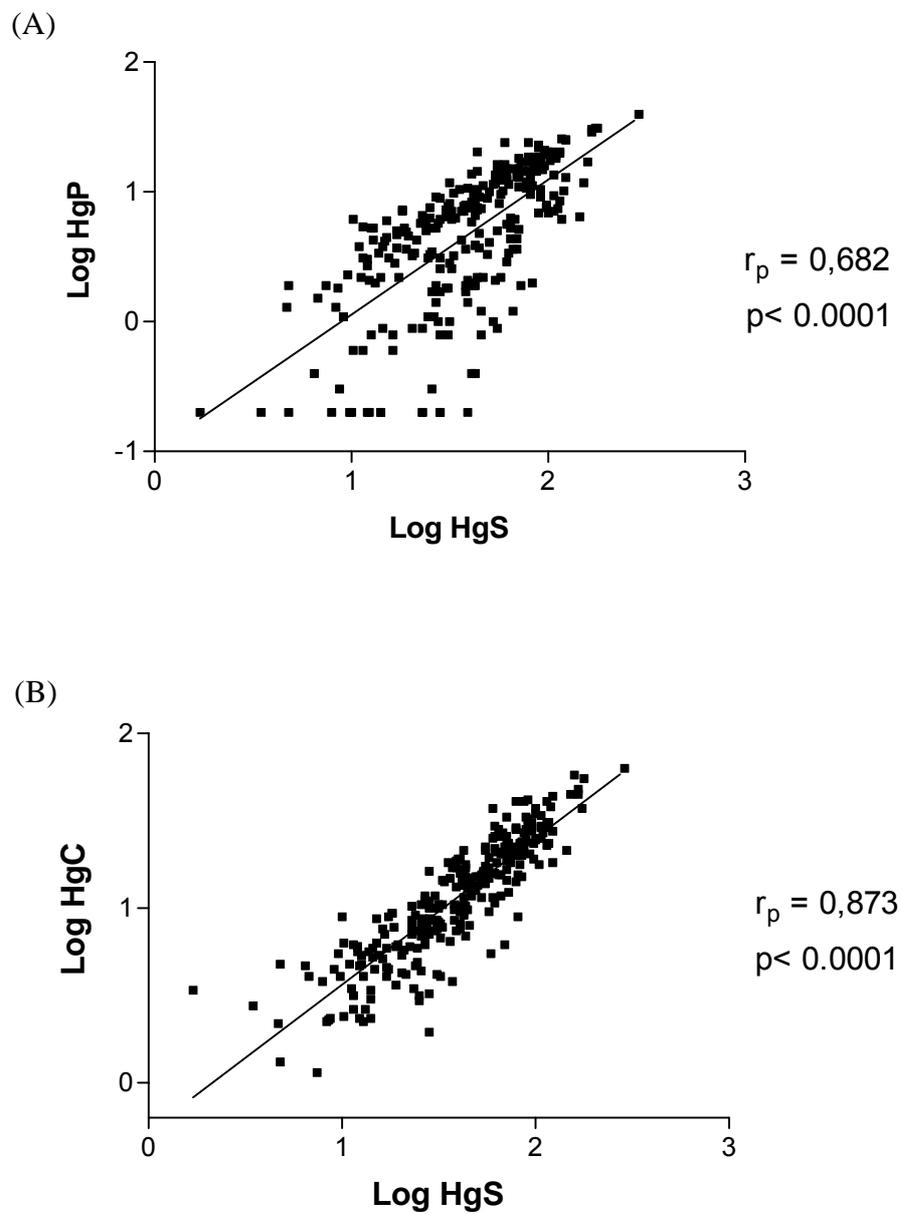


Figura 3. Correlação entre os níveis de mercúrio: (A) no plasma e no sangue e (B) no sangue e no cabelo.

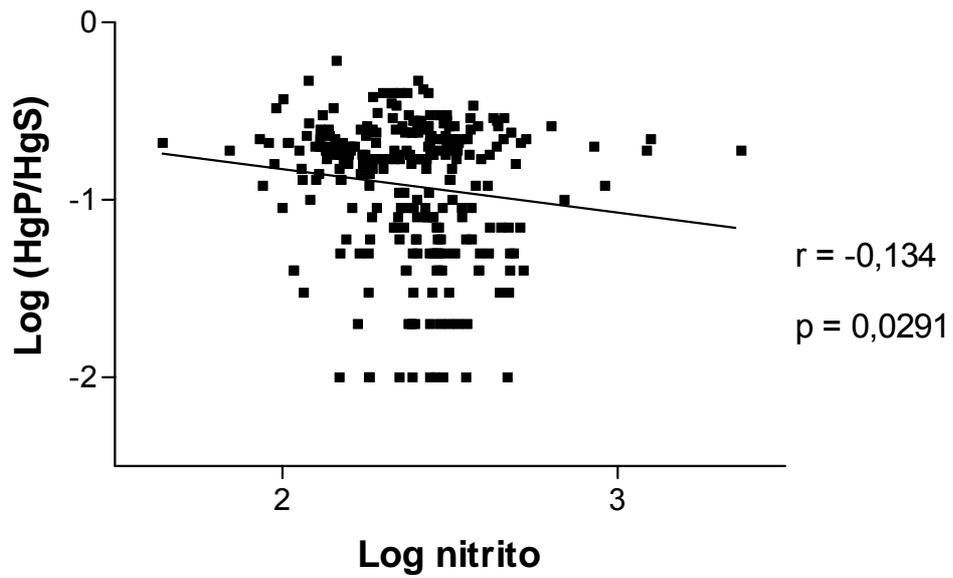


Figura 4. Correlação entre os níveis de nitrito plasmático e a razão HgP/HgS.

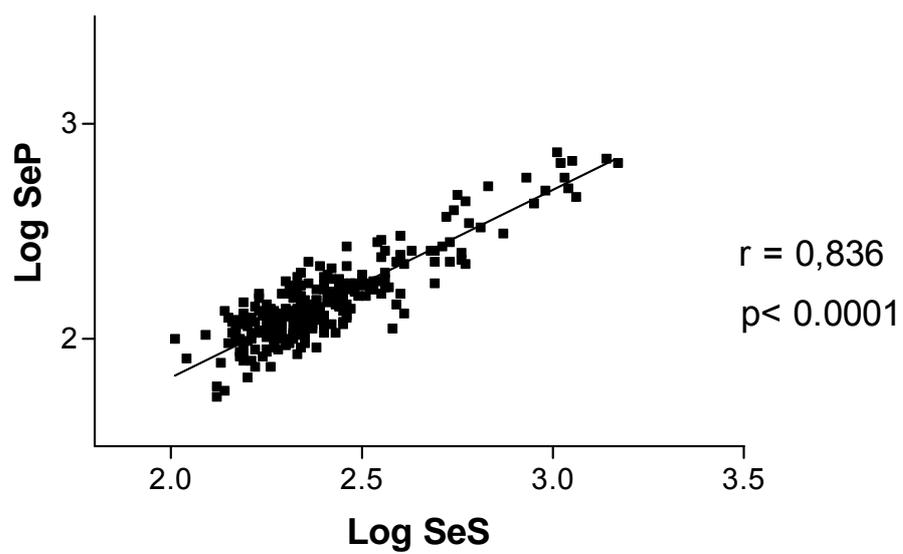


Figura 5. Correlação entre os níveis de selênio nas amostras de sangue e plasma.

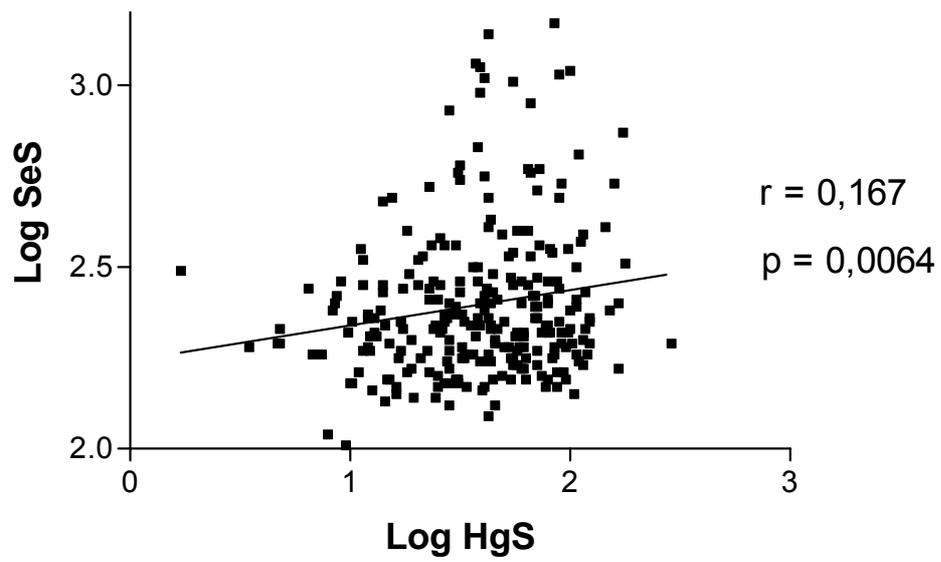


Figura 6. Correlação entre os níveis de selênio e mercúrio presentes no sangue dos voluntários do estudo.

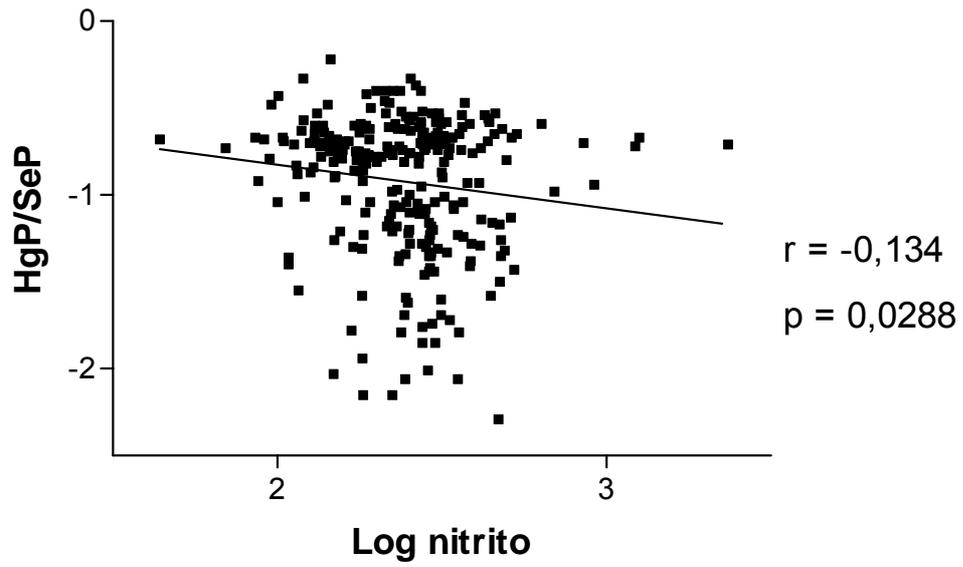


Figura 7. Correlação entre os níveis de nitrito plasmático e a razão HgP/SeP.

DISCUSSÃO

V - DISCUSSÃO

A exposição ao metilmercúrio (MeHg) ocorre quase que exclusivamente pelo consumo de alimentos provenientes do ambiente aquático, principalmente por peixes, enquanto o restante dos alimentos de uma maneira em geral apresentam quantidades muito reduzidas desse organometal (Berglund et al, 2005). A concentração de mercúrio total no sangue é frequentemente usada para avaliar a exposição a MeHg em indivíduos que conhecidamente têm sua alimentação rica no consumo de peixes.

Após absorção, o MeHg entra nos eritrócitos e se complexa principalmente com a glutathiona intracelular (Naganuma et al., 1980). A formação deste complexo tem um importante papel no transporte e distribuição do mercúrio para os tecidos (Hirayama, 1980).

A literatura reporta que cerca de 87% do mercúrio orgânico no sangue se localiza dentro dos eritrócitos (Berglund et al, 2005).

A fração livre no plasma, mesmo que em menor quantidade, é a que está mais disponível para se distribuir aos tecidos, podendo ser considerada então a de maior importância quanto ao potencial tóxico. Os níveis plasmáticos de mercúrio se correlacionam fortemente com os valores encontrados no sangue total (WHO, 1990). De forma concordante, observamos neste estudo uma forte correlação entre os níveis de mercúrio encontrado no plasma e no sangue total, como pode ser observado pela Figura 1A. Entretanto, observamos uma grande variação nas frações de mercúrio plasmáticas nos voluntários em estudo (de 1,0% a 61%). Estes resultados diferem de um estudo recente de Berglund e cols, onde aproximadamente 7% do mercúrio se encontrava no plasma (Berglund et al, 2005).

Entretanto, esses autores avaliaram um número reduzido de voluntários (n=28) e que diferentemente do nosso estudo não estavam expostos ao mercúrio.

Além do sangue, o cabelo tem sido altamente usado como marcador de exposição ao mercúrio (Grandjean, 1994). A facilidade de amostragem e armazenamento tem tornado o cabelo, um interessante marcador no monitoramento de indivíduos expostos, além de refletir a concentração de metilmercúrio circulante no sangue (WHO, 1990; Cernichiari, 1995), uma vez que 91% do mercúrio encontrado nos cabelo está na forma orgânica (Berglund, 2005; WHO,1990). Além disso, a análise de frações do cabelo pode fornecer um resultado da exposição temporal do indivíduo, o que auxilia nos caso em que o nível de exposição altera com o tempo (Berglund, 2005). Em nosso estudo houve uma forte correlação entre os níveis de mercúrio encontrados no cabelo e os níveis sanguíneos de mercúrio (Figura 1B). Além disso, em média 86% do mercúrio total no cabelo estava na forma orgânica (Tabela 1), em concordância com estudos anteriores (Berglund et al, 2005).

O alvo principal da exposição ao metilmercúrio é o sistema nervoso central. O tecido cerebral é bastante vulnerável a toxicidade do metilmercúrio, levando a sérios danos no desenvolvimento neurológico. Entretanto, nos últimos anos tem sido observado um risco aumentado de doenças cardiovasculares com o aumento dos níveis de mercúrio em alguns marcadores biológicos de exposição como cabelo e unha. Entretanto, os resultados destes estudos têm sido muitas vezes conflitantes.

Em estudo realizado recentemente, foram verificados níveis 15% superiores de mercúrio nas unhas dos pés de 684 voluntários com prévio diagnóstico de infarto do miocárdio em comparação a 724 voluntários sadios (Guallar, 2002). Estudo realizado em um grupo de finlandeses mostrou que níveis elevados de mercúrio no

cabelo estão associados à progressão acelerada de aterosclerose da carótida (Salonen, 2000). Entretanto, estudos realizados em 1987, nos Estados Unidos, com 51.529 homens de idades entre 40 e 75 anos, não mostraram nenhuma relação entre os níveis de mercúrio nas unhas e a incidência de doenças cardiovasculares (Yoshizawa, 2002).

Mesmo com indícios de que níveis elevados de exposição ao MeHg possam estar associados com doenças cardiovasculares, os mecanismos pelos quais essa interação ocorre ainda não são conhecidos. Uma hipótese é de que o metilmercúrio esteja expressando esse efeito tóxico através de alterações na biodisponibilidade do óxido nítrico, alterando assim a homeostase vascular. Kishimoto e cols (1995) demonstraram em seus estudos com células endoteliais haver uma diminuição na produção de óxido nítrico de forma dose-dependente quando da presença de MeHg. Em outro estudo, Kuo e cols (2002) relataram uma alteração na homeostase intracelular do cálcio, ativando proteína quinase A e causando uma diminuição na síntese de óxido nítrico.

No Brasil os estudos sobre os efeitos cardiotoxicos do metilmercúrio são ainda escassos. Em estudo preliminar publicado em 2006 em uma população de ribeirinhos residentes as margens do Rio Tapajós no Pará não foi observada uma relação de dose-resposta entre o consumo de peixe e a pressão arterial (Fillion et al, 2006). Outro estudo realizado com índios Munduruku e Kayabi residentes as margens dos rios Tapajós e Tombras não observou correlação entre os níveis de mercúrio no cabelo e pressão arterial sistólica e diastólica (Dorea, 2005). Estes estudos utilizaram os níveis de mercúrio no cabelo como marcadores de exposição. Entretanto, como mencionado anteriormente, os níveis plasmáticos ou a fração de mercúrio no plasma podem se associar melhor com os efeitos tóxicos deste metal

que os do mercúrio no cabelo, sangue ou unha. Em nosso estudo não foi observada correlação entre os valores de nitrito e os níveis de mercúrio no sangue, plasma e cabelo, como pode ser visto na Tabela 2. Contudo, quando confrontamos os valores de nitrito com a razão HgP/HgS (fração de mercúrio plasmática) (Figura 2), notamos uma correlação negativa significativa, sugerindo que quanto mais mercúrio livre houver no plasma menor serão os níveis de NO, o que acarretaria alterações vasculares como vasoconstrição, agregação plaquetária, recrutamento e adesão leucocitária. Dessa forma, a fração plasmática de mercúrio pode melhor refletir os efeitos tóxicos da exposição, como é mostrado na Figura 2.

Cabe também destacar que a população ribeirinha avaliada apresenta uma característica peculiar na dieta que pode influenciar os resultados com relação aos efeitos cardioprotetores do metilmercúrio. A dieta destas comunidades é rica em compostos com conhecidos efeitos cardioprotetores, como selênio e frutas cítricas (Passos, 2003).

A ingestão de selênio é reconhecida como um dos fatores nutricionais de maior importância para minimizar os efeitos tóxicos do MeHg, embora sua significância na exposição crônica ao organo-metal ainda não esteja muito clara. Estudos mostram que altas concentrações sanguíneas de selênio diminuem a toxicidade de alguns metais pesados como o mercúrio (Magos et al, 1980)

Suzuki e cols relataram em seu estudo sobre o metabolismo do selênio que, uma vez na corrente sanguínea, esse micronutriente é captado rapidamente pelos eritrócitos, reduzido a Se^{2-} e devolvido ao plasma onde se liga a albumina, seguindo então para o fígado onde é incorporado a selenoproteínas, principalmente. Selenoproteína-P (Sel-P) é uma selenoproteína presente no plasma, contendo aproximadamente 65% do selênio plasmático (Read et al, 1990). A forte ligação de

selênio a Sel-P ocorre pelo fato dessa seleproteína possuir 10 resíduos de selenocisteína (SeCys), e portanto maior capacidade de transportar selênio entre os tecidos, quando comparada a outras selenoproteínas (Suzuki et al, 1999). A Sel-P tem um papel importante no organismo, participando da proteção contra estresse oxidativo, por reagir com espécies reativas de oxigênio(ROS) e como uma proteína transportadora de selênio do fígado para os demais tecidos. Neste sentido, os níveis plasmáticos de selênio podem atenuar os efeitos tóxicos do mercúrio.

No presente estudo foi observada uma forte correlação entre os níveis de selênio no sangue total e no plasma, como pode ser visualizado pela Figura 3.

Nossos resultados também mostraram que há correlação entre os níveis de selênio e mercúrio no sangue (Fig. 4) e estão em acordo com o estudo de Grandjean e cols (1995), que relataram semelhante correlação em indivíduos que tinham sua alimentação rica em peixes, e com um estudo recente realizado em uma população ribeirinha residente as margens do rio Tapajós. (Lemire, 2006).

No grupo estudado neste trabalho, a exposição ao MeHg ocorre simultaneamente a ingestão de selênio, não só pelo consumo de peixes mas também castanhas. Portanto consideramos o selênio como um fator protetor importante nos efeitos cardiovasculares causados pelo MeHg e que podem mascarar estes efeitos na população estudada ou em outras populações com elevado consumo de compostos antioxidantes em sua alimentação.

Quando correlacionamos os níveis de nitrito plasmático com a razão HgP/SeP (Figura 5) observamos uma correlação negativa. Isto implica que uma redução dos níveis de nitrito está relacionada com um aumento da razão HgP/SeP, indicando o possível efeito protetor do selênio no plasma. Podemos assim inferir que

níveis mais elevados de selênio podem estar reduzindo o efeito do MeHg sobre a produção de nitrito e conseqüentemente sobre a biodisponibilidade de óxido nítrico.

CONCLUSÕES

VI – CONCLUSÕES

Este trabalho é o primeiro a avaliar a relação existente entre os diversos marcadores de exposição ao Hg (sangue, plasma e cabelo) e a possível relação de cada um destes marcadores com a biodisponibilidade do óxido nítrico em indivíduos expostos ao metal na região Amazônica. Também foi avaliado o efeito dos níveis de selênio no sangue e plasma nos mesmos indivíduos sobre a produção de óxido nítrico.

Apesar de não ter sido evidenciado nenhuma relação entre a biodisponibilidade do NO e os níveis de mercúrio nos marcadores comumente utilizados para avaliar a exposição a este organometal, este estudo mostrou que existe correlação entre os níveis de nitrito plasmático e a razão HgP/HgS. Isto indica que a fração plasmática de Hg pode ser um melhor marcador dos efeitos cardiotoxicos da exposição ao metilmercúrio. Cabe também destacar o efeito protetor observado do selênio sobre a produção do óxido nítrico em indivíduos expostos ao metilmercúrio.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREW, P.J.; MAYER, B. **Enzymatic function of nitric oxide synthase.** Cardiovasc Res. vol.43, 1999. p.521-31.
- BAKIR, F.; DAMLUJI, S.F.; AMIN-ZAKI, L.; et al. **Methylmercury poisoning in Iraq.** Science. vol.181(96),1973. p.230-41.
- BARBOSA, F. JR.; PALMER, C. D.; KRUG, F. J.; et al. **Determination of total mercury in whole blood by flow injection cold vapor atomic absorption spectrometry with room temperature digestion using tetramethylammonium hydroxide.** J. Anal. At. Spectrom. vol.19(8), 2004. p.1000-5.
- BAYLIS, C.; VALLANCE, P. **Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine--what does this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide system?** Curr Opin Nephrol Hypertens vol.7(1), 1998. p.59-62.
- BECKMAN, J.S., KOPPENOL, W.H. **Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.** Am J Physiol. vol.271, 1996. p.1424-37.
- BERGLUND, M.; LIND, B.; BJORNBERG, K.A.; et al. **Inter-individual variations of human mercury exposure biomarkers: a cross-sectional assessment.** Environmental Health. vol.3, 2005. p.4-20.
- BRABO, E.S.; SANTOS, E.D.; JESUS, I.M.; et al. **Mercury level in fish consumed by the Sai Cinza indigenous community, Munduruku Reservation, Jacareacanga County, State of Para, Brazil.** Cad. Saúde Pública. vol.15(2), 1999. p.325-331.

- BURK, R.F.; HILL, K.E. **Regulation of seleproteins.** Annu Rev Nutr. vol.13, 1993. p.65-81.
- BUTLER, J.A.; BAILSTEIN, M.A.; WHANGER, P.D. **Influence of dietary methionine on the metabolism of seleno-methionine in rat.** Journal of Nutrition. vol.119, 1989. p.1001-1009.
- CABANERO, A.I.; MADRID, Y.; CAMARA, C. **Selenium and mercurybioaccessibility in fish samples: na in vitro digestion method.** Analytica Chimica Acta. vol. 526, 2004. p.51-61.
- CASTILLO, L.; BEAUMIER, L.; AJAMI, A.M.; et al. **Whole body nitric oxide synthesis in healthy men determined from [15N] arginine-to-[15N]citrulline labeling.** Proc Natl Acad Sci USA. vol93(21), 1996. p.11460-5.
- CASTILLO, L.; BEAUMIER, L.; AJAMI, A.M.; et al. **Whole body nitric oxide synthesis in healthy men determined from [15N] arginine-to-[15N]citrulline labeling.** Proc Natl Acad Sci. vol.93(21), 1996. p.11460-5.
- CASTOLDI, A.F.; COCCINI, T.; MANZO, L. **Neurotoxic and molecular effects of methylmercury in humans.** Rev Environ Health. vol.18, 2003. p.19-31.
- CERNICHIARI, E.; TORIBARA, T.Y.; LIANG, L.; et al. **The biological monitoring of mercury in the Seychelles study.** Neurotoxicology. vol16(4), 1995. p.613-28.
- CHAN, H.M.; EGELAND, G.M. **Fish consumption, mercury exposure, and heart diseases.** Nutr Rev. vol.62(2), 2004. p.68-72.
- CLARKSON, T.W. **The three modern faces of mercury.** Environ Health Perspect. v.110 (suppl 1), 2002. p.11-23.

- Control of Pre-Analytical Variation in Trace Element Determinations; Approved Guideline, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Document C38-A, 15, 1997.
- COOKE, J.P.; DZAU, V.J. **Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease.** Annu Rev Pharmacol Toxicol. vol.41, 1997. p.489-509.
- COSBY, K.; PARTOVI, K.S.; CRAWFORD, J.H.; et al. **Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation.** Nat Med. vol.9(12), 2003. p.1498-505.
- COUNTER, S.A.; BUCHANA, L.H. **Mercury exposure in children: a review.** Toxicol Appl Pharmacol. vol,198(2), 2004. p.209-30.
- Crit Rev Toxicol. vol. 8(1), 1980. p.1-42.
- DAVIS, K.L.; MARTIN, E.; TURKO, I.V.; et al. **Novel effects of nitric oxide.** Annu Rev Pharmacol Toxicol. vol.41, 2001. p.203-36.
- DAVIS, K.L.; MARTIN, E.; TURKO, I.V.; et al. **Novel effects of nitric oxide.** Annu Rev Pharmacol Toxicol. vol.41, 2001. p.203-36.
- DOLBEC, J.; MERGLER, D.; LARRIBE, F.; et al. **Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population, Brazil.** Sci Total Environ. vol.271, 2001. p.87-97.
- DOREA J.G., BARBOSA A.C., SILVA G.S. **Fish mercury bioaccumulation as a function of feeding behavior and hydrological cycles of the Rio Negro, Amazon.** Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. vol.142(3-4), 2006. p.275-83.

- DOREA J.G., BARBOSA A.C., SILVA G.S. **Fish mercury bioaccumulation as a function of feeding behavior and hydrological cycles of the Rio Negro, Amazon.** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* vol.142(3-4), 2006. p.275-83.
- DOREA, J.G.; SOUZA, J.R.; RODRIGUES, P.; et al. **Hair mercury (signature of fish consumption) and cardiovascular risk in Munduruku and Kayabi Indians of Amazonia.** *Environ Res.* vol.97(2), 2005. p.209-19.
- FADINI, P.S.; JARDIM, W.F. **Is the Negro River Basin (Amazon) impacted by naturally mercury?** *The Science of the Total Environment.* vol.275, 2001. p.71-82.
- FALNOGA, I.; TUSEK-ZNIDARIC, M.; HORVAT, M.; et al. **Mercury, selenium and cadmium in human autopsy samples from Idrija residents and mercury mine workers.** *Environ Res A.* vol.84, 2000. p.211-218.
- FILLION, M.; MERGLER, D.; PASSOS, C.J.S.; et al. **A preliminary study of mercury exposure and blood pressure in the Brazilian Amazon.** *Envir Health.* vol. 10, 2006. p.5-29.
- FITZGERALD, W.F.; CLARKSON, T.W. **Mercury and monomethylmercury: present and future concerns.** *Environ Health Perspect.* vol.96 (Dec), 1991. p.159-66.
- FORSTROM, J.W.; ZAKOWSKI, J.J.; TAPPEL, A.L. **Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine.** *Biochemistry.* vol.17(13), 1978. p.2639-44.
- FREDRIKSSON, A.; GARDLUND, A.; BERGMAN, K.; et al. **Effects of maternal dietary supplementation with selenite on the postnatal development of rat**

- offspring exposed to methylmercury in utero.** *Prarmacol Toxicol.* vol.72, 1993. p.377-382.
- GANTHER, H.; GOUDIE, C.; SUNDE, M.; et al. **Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna.** *Science.* vol.175, 1972. p.1122-1124.
- GLADWIN, M.T.; OGNIBENE, F.P. ; PANNELL, L.K. ; et al. **Relative role of heme nitrosylation and beta-cysteine 93 nitrosation in the transport and metabolism of nitric oxide by hemoglobin in the human circulation.** *Proc Natl Acad Sci.* vol.97(18), 2000. p.9943-8.
- GLADWIN, M.T.; SHELHAMER, J.H.; SCHECHTER. **Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans.** *Proc Natl Acad Sci USA.* vol.97, 2000. p.11482-7.
- GRANDJEAN, P.; WIEHE, P.; NEEDHAM,L.; et al. **Relation of a seafood diet to mercury, selenium, arsenic and polychlorinated biphenyl and other organochlorine concentration in human milk.** *Environmental Research.* vol.71, 1995. p.29-38.
- GREGUS, Z.; GYURASICS, A.; CSANAKY, I.; et al. **Effects of methylmercury and organic acid mercurials on the deposition of exogenous selenium in rats.** *Toxicol Appl Pharmacol.* vol.174, 2001. p.177-187.
- GUALLAR, E.; SANZ-GALLARDO, M.I.; VAN'T VEER, P.; et al. **Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction.** *N Engl J Med.* vol.347(22), 2002. p.1747-54.
- HARADA, M. **Environmental Contamination and Human Rights — Case of Minamata Disease.** *Organization & Environment.* vol.8(2), 1994. p.141-154.

- HARADA, M.; NAKANISHI, J.; YASODA, E.; et al. **Mercury pollution in the Tapajos River basin, Amazon: mercury level of head hair and health effects.** Environ Int. vol.27(4), 2001. p.285-90.
- HARRIS, H.H.; PICKERING, I.J.; GEORGE, G.N. **The chemical form of mercury in fish.** Science. vol.301 (5637), 2003. p.1203.
- HIBBS, J.B.JR.; WESTENFELDER, C.; TAINTOR, R.; et al. **Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy.** J Clin Invest. vol.89(3), 1992. p.867-77.
- HIRAYAMA, K.; YASUTAKE, A. **In vivo degradation of methylmercury – its mechanism and significance in methylmercury-induced neurotoxicity. In: methylmercury poisoning in Minamata and Niigata, Japan.** 2001. p.103-110.
- IMURA, N. **The role of micronutrient, selenium, in the manifestation of toxicity of heavy metals. In: new concepts and development in toxicology.** Elsevier. 1986. p.115-123.
- IPCS (International Programme on Chemical Safety), 1990 IPCS (International Programme on Chemical Safety), 1990. Methylmercury (Environmental Health Criteria 101). World Health Organisation, Geneva.
- ISCIOGLU, B.; HENDEN, E. **Determination of selenoamino acids by gas chromatograph-mass spectrometry.** Analytica Chimica Acta. vol.505, 2004. p.101-106.
- JEEROOBURKHAN, N.; JONES, L.C.; BUJAC, S.; et al. **Genetic and environmental determinants of plasma nitrogen oxides and risk of ischemic heart disease.** Hypertension. vol.38(5), 2001. p.1054-61.

- KISHIMOTO, T.; OGURI, T.; TADA, M. **Effect of methylmercury (CH₃HgCl) injury on nitric oxide synthase (NOS) activity in cultured human umbilical vascular endothelial cells.** *Toxicology*. vol.103(1), 1995. p.1-7.
- KOSTA, M.; BYRNE, A.; ZELLENKO, V. **Correlation between selenium and mercury in man following exposure to inorganic mercury.** *Nature*. vol.254, 1975. p.238-239.
- KRYUKOV, G.V.; CASTELIANO, S.; NOVOSELOV, S.V.; et al. **Characterization of mammalian selenoproteomes.** *Science*. vol.300, 2003. p.1439-1443.
- KUO, T.C.; HUANG, C.L.; LIN-SHIAU, S.Y. **Methylmercury inhibits nitric oxide production mediated by Ca(2+) overload and protein kinase A activation.** *Toxicology*. vol.176(1-2), 2002. p.113-22.
- LAUER ,T.; KLEINBONGARD, P.; KELM, M. **Indexes of NO bioavailability in human blood.** *News Physiol Sci*. vol.17, 2002. p.251-5.
- LEMIRE, M.; MERGLER, D.; GILLION, M.; et al. **Elevated blood selenium levels in the Brazilian Amazon.** *Science of the total Environmental*. vol.366, 2006. p.101-111.
- MAGOS, L.; WEBB, M. **The interactions of selenium with cadmium and mercury.**
- MALM, O. **Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon.** *Environ Res*. vol.77, 1998. p.73-78.
- MATSUO, N.; SUZUKI, T.; AKAGI, H. **Mercury concentration in organs of contemporary Japanese.** *Arch Environ Health*. vol.44(5), 1989. p.298-303.
- MONCADA S, HIGGS A. **The L-arginine-nitric oxide pathway.** *N Engl J Med*. vol.329(27), 1993. p.2002-12.

- MOTSENBOCKER, M.A.; TAPPEL, A.L. **Selenocysteine-containing proteins from rat and monkey plasma.** *Biochim Biophys Acta* vol.704(2), 1982. p.253-60.
- NACIONAL RESEARCH COUNCIL. **Toxicological effects of methylmercury.** National Academy Press, 2000.
- NAGANUMA, A.; KOYAMA, Y.; IMURA, N. **Behavior of methylmercury in mammalian erythrocytes.** *Toxicology and Appl Pharmacol.* vol.54, 1980. p.405-410.
- NAKANE, T.; ASAYAMA, K.; KODERA, K.; et al. **Effect of selenium deficiency on cellular and extracellular glutathione peroxidases: immunochemical detection and mRNA analysis in rat kidney and serum.** *Free Radical in Biology and Medicine.* vol.25, 1998. p.504-511.
- NOBUNAGA, T.; SATOH, H.; SUZUKI, T. **Effects of sodium selenite on methylmercury embryotoxicity and teratogenicity in mice.** *Toxicol Appl Pharmacol.* vol.47, 1979. p.79-88.
- NUTTALL, K.L. **Interpreting mercury in blood and urine of individual patients.** *Annals of Clinical & Laboratory Science.* vol.34, 2004. p.235-250.
- OGRA, Y.; ISHIWATA K.; TAKAYAMA, H. **Identification of a novel selenium metabolite, Se-methyl-N-acetylselenohexosamine, in rat urine by high-performance liquid chromatography--inductively coupled plasma mass spectrometry and--electrospray ionization tandem mass spectrometry.** *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* vol.767(2), 2002. p.301-12.
- PARIZEK, J.; OSTADALOVA, I. **The protective effect of small amounts of selenite in sublimate intoxication.** *Experientia.* vol.23, 1967. p.142-3.

- PASSOS, J.C.; MERGLER, D.; GASPAR, E.; et al. **Eating tropical fruit reduces mercury exposure from fish consumption in the Brazilian Amazon.** Environ Res. vol.93, 2003. p.123-130.
- RASSAF, T.; FEELISCH, M.; KELM, M. **Circulating NO pool: assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues.** Free Radic Biol Med. vol.36(4), 2004. p.413-22.
- RHODES, P.; LEONE, A.M. ; FRANCIS, P.L. ; et al. **The L-arginine:nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans.** Biochem Biophys Res Commun. vol.209(2), 1995. p.590-6.
- RHODES, P.; LEONE, A.M.; FRANCIS, P.L.; et al. **The L-arginine:nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans.** Biochem Biophys Res Commun. vol.209(2), 1995. p.590-6.
- ROSSELLI, M.; IMTHURN, B.; KELLER, P.J.; et al. **Circulating nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17 beta-estradiol and norethisterone acetate. A two-year follow-up study.** Hypertension. vol.25(4 Pt2), 1995. p.848-53.
- SAITO, Y.; HAYASHI, T.; TANAKA, A.; et al. **Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein P.** Journal of Biological Chemistry. vol.274, 1999. p.2866-2871.
- SALONEN, J. T.; SEPPANEN, K., NYSSONEN, K., et al. **Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland.** Atherosclerosis. Vol.148(2), 2000. p.265-73.

- SALONEN, J.T.; SEPPANEN, K.; NYSSONEN, K.; et al. **Intake of mercury from fish, lipid peroxidation and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular and any death in eastern Finnish men.** *Circulation.* vol.91, 1995. p.645-55.
- SANDER, M.; CHAVOSHAN, B.; VICTOR, R.G. **A large blood pressure-raising effect of nitric oxide synthase inhibition in humans.** *Hypertension.* vol.33, 1999. p.937-42.
- SANDHOLM, M. **The initial fate of a trace amount of intravenously administered selenite.** *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* vol.33(1), 1973. p.1-5.
- SUZUKI, K.T.; ITOH, M. **Metabolism of selenite labeled with enriched stable isotope in the bloodstream.** *Journal of Chromatography B.* vol.692, 1997. p.15-22.
- SUZUKI, R.T.; ISHIWATA K.; OGRA, Y. **Incorporation of selenium into selenoprotein P and extracellular glutathione peroxidase: HPLC-ICP MS data with enriched selenite.** *Analyst.* vol.124, 1999. p.1749-1754.
- SUZUKI, R.T.; OGRA, Y. **Metabolic pathway for selenium in the body: speciation by HPLC-ICP MS with enriched Se.** *Food Additives and Contaminants.* vol.19, no.10, 2002. p.974-983.
- SUZUKI, T.K.; ISHIWATA, K.; OGRA, Y. **Incorporation of selenium into selenoprotein P and extracellular glutathione peroxidases: HPLC-ICPMS data with enriched selenite.** *Analyst.* vol.124, 1999. p.1749-1754.
- TAMASHIRO, H.; AKAGI, H.; ARAKAKI, M.; et al. **Causes of death in Minamata disease: analysis of death certificates.** *Int Arch Occup Environ Health.* vol.54(2), 1984. p.135-46.

- TAO, G.; WILLIE, S.N.; STURGERON, R.E. **Determination of total mercury in biological tissues by flow injection cold vapor generation atomic absorption spectrometry following tetramethylammonium hydroxide digestion.** *Analyst.* vol.123(6), 1998. p.1215-8.
- THOMAS, G.D.; ZHANG, W.; VICTOR, R.G. **Nitric oxide deficiency as a cause of clinical hypertension: promising new drug targets for refractory hypertension.** *Jama.* vol. 285, 2001. p.2055-7.
- VIRTANEN, J.K.; RISSANEN, H.T.; VOUTILAINEN, S.; et al. **Mercury as a risk factor for cardiovascular diseases.** *J Nutr Biochem.* vol.18(2), 2007. p.75-78.
- WANG, X.; TANUS-SANTOS, J.E.; REITER, C.D.; et al. **Biological activity of nitric oxide in the plasmatic compartment.** *Proc Natl Acad Sci USA.* vol.101(31), 2004. p.11477-82.
- WANG, X.L.; MAHANEY, M.C.; SIM, A.S.; et al. **Genetic contribution of the endothelial constitutive nitric oxide synthase gene to plasma nitric oxide levels.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* vol.17(11), 1997. p.3147-53.
- WATANABE, C. **Modification of mercury toxicity by selenium: practical importance?** *Tohoku J Exp Med.* vol.196, 2002. p.71-77.
- Water quality criterion for the protection of human health: methylmercury. Washington (USA), Environmental Protection Agency, 2001.
- WHO: **Methylmercury.** In *Environmental Health Criteria.* vol.101 IPCS, Geneva. 1990.
- YOSHIZAWA, K.; RIMM, E. C.; MORRIS, J. S. **Mercury and the risk of coronary heart disease in men.** *N Engl J Med.* Vol.347(22), 2002. p.1755-60.

ZANÃO, R.A.; BARBOSA, F.Jr.; SOUZA, R.R.; et al. **Direct determination of selenium in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry using W-Rh-coated platform and co-injection of Rh as thermal stabilizer.** *Spectrochimica Acta Part B.* vol.57, 2002. p.291-301.